

ヒト軟骨細胞のサイトカイン刺激によるIL-1 発現 とDNAメチル化

著者	橋本 功
号	77
学位授与番号	2578
URL	http://hdl.handle.net/10097/45787

氏 名（本籍）	橋 本 功
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 2 5 7 8 号
学位授与年月日	平 成 20 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学 位 論 文 題 目	ヒト軟骨細胞のサイトカイン刺激による IL-1 β 発現と DNA メチル化

（主 査）

論 文 審 査 委 員	教授 井 樋 栄 二	教授 相 場 節 也
	教授 荒 井 陽 一	

論文内容要旨

【背景】

ヒトの変形性関節症 (osteoarthritis ; OA) では、軟骨細胞が正常軟骨細胞から形質を変え、軟骨変性を惹起するマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloprotease ; MMP) 群や a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs (ADAMTS)-4, 5 等のアグリカナーゼ、またインターロイキン (interleukin ; IL)-1 β や腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor ; TNF) α 等の炎症性サイトカインを産生する。これらの酵素やサイトカインの発現制御には、DNA メチル化が関与する。また正常軟骨細胞に炎症性サイトカインを作用させると、OA の軟骨細胞同様に、これらの酵素やサイトカインを発現する。しかし変性軟骨細胞での DNA メチル化と蛋白分解酵素やサイトカイン発現の関係は未だ不明である。今回私は炎症性サイトカインの刺激により、正常軟骨細胞が変性軟骨細胞と同様に IL-1 β の発現能を獲得する点に着目した。正常軟骨細胞で、DNA 脱メチル化試薬の投与で IL-1 β 発現を誘導できれば、プロモーター領域の DNA 脱メチル化が IL-1 β 発現に先立つ重要な因子であることを示せる。さらにサイトカイン刺激による IL-1 β 発現誘導に DNA 脱メチル化が伴っていれば、サイトカインによる DNA 脱メチル化と IL-1 β 発現の密接な関係を示すことが出来る。

【目的】

本研究では、ヒト培養関節軟骨細胞を炎症性サイトカインで刺激した際の IL-1 β の誘発及び、その発現に IL-1 β 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が関与することの検証を目的とした。また脱メチル化試薬 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) での刺激も行い、DNA 脱メチル化が IL-1 β 遺伝子の発現を誘導することの検証も目的とした。

【方法】

大腿骨頸部骨折患者 (80-91 歳, 平均 82 歳, 男性 1 名, 女性 5 名) の手術時に摘出した 6 大腿骨頭の、肉眼的に変性所見のない非荷重部から、深層の軟骨片を無菌的に切り出した。これらを未培養群と、無添加培養群 (対照群), 5-aza-dC, IL-1 β , TNF α と oncostatin M (OSM) の混合液をそれぞれ添加して培養した計 5 群に分けた。5-aza-dC は、DNA メチルトランスフェラーゼ (DNA methyltransferase ; DNMT) 1 を阻害して DNA の脱メチル化を誘導する試薬である。同一骨頭軟骨由来の未培養と培養後の細胞から、ゲノム DNA と全 RNA を同時抽出した。得られた RNA から、IL-1 β と DNMT1 の発現量を、逆転写一定量のポリメラーゼ連鎖反応 (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction ; qRT-PCR) で相対定量し

た。また IL-1 β 遺伝子プロモーター領域の、転写開始部位から上流 299 塩基（-299 位）に位置する CpG メチル化率をメチル化感受性制限酵素（methylation-sensitive restriction enzymes；MSRE）法で、定量的ポリメラーゼ連鎖反応（quantitative polymerase chain reaction；qPCR）を用いて定量した。CpG とは、DNA 配列中でシトシン（C）の次にグアニン（G）が配列している部位を指し、DNA メチル化が生じる部位である。また培地中への IL-1 β の放出量を、enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）で検出した。

【結 果】

IL-1 β の発現は、対照群と比較して全ての薬剤添加群で増加し、IL-1 β 添加群と TNF α /OSM 混合添加群で特に多かった。DNMT1 の発現は、対照群と添加培養群の間で明らかな差はなかった。IL-1 β プロモーター領域中の CpG メチル化率は、未培養群と比べ対照群で低下した。5-aza-dC 添加群では対照群より低く、IL-1 β 添加群、TNF α /OSM 混合添加群ではさらに低下していた。ELISA では、対照群と 5-aza-dC 添加群で IL-1 β 産生を認めない一方、IL-1 β 添加群と TNF α /OSM 混合添加群で有意な産生が認められた。

【考 察】

炎症性サイトカインがヒト培養軟骨細胞でタンパク分解酵素や、サイトカインの異常発現を誘導する際、上方調節または DNA メチル化による抑制解除のいずれかの機序が考えられる。本研究では、サイトカインでの介入培養群が明らかな DNA 脱メチル化を示したことから、後者の可能性が高いと考えられる。DNA 脱メチル化試薬が IL-1 β の発現を誘導したこと、加えてサイトカイン添加培養群では DNA メチル化率が低いほど IL-1 β の発現量が多かったことから、軟骨細胞が DNA 脱メチル化を介して IL-1 β の発現能を獲得することが強く示唆された。本研究は、軟骨細胞でサイトカイン刺激による DNA 脱メチル化と遺伝子発現の関係を初めて示したものである。

【結 論】

ヒト培養関節軟骨細胞に炎症性サイトカインを作用させると IL-1 β の発現が増加し、それに DNA 脱メチル化が関与していることが示唆された。

審査結果の要旨

研究の要旨：本研究では、ヒト培養関節軟骨細胞を種々の炎症性サイトカインで刺激した際の IL-1 β 発現の誘発及び、その発現に IL-1 β 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が関与することの検証を目的とした。IL-1 β の発現は、対照群と比較して全ての薬剤添加群で増加し、IL-1 β 添加群と TNF α /OSM 混合添加群で特に多かった。IL-1 β プロモーター領域中の CpG メチル化率は、IL-1 β 添加群、TNF α /OSM 混合添加群で著明に低下していた。ELISA では、対照群で IL-1 β 産生を認めない一方、IL-1 β 添加群と TNF α /OSM 混合添加群で有意な産生が認められた。以上から、炎症性サイトカインがヒト培養軟骨細胞でタンパク分解酵素や、サイトカインの異常発現を誘導する機序として、DNA 脱メチル化による抑制解除が考えられる。今後、軟骨基質の破壊に関与する DNA メチル化状態と転写因子の関係など、変形性関節症の病因解明に迫る研究の発展が期待される。

斬新さ：これまで変形性関節症に関与するサイトカインや軟骨基質分解酵素の発現に DNA メチル化の状態の変化が伴うことは示されていたが、正常軟骨で実験的に例証したことはない。この点において本研究は斬新である。

重要性：変形性関節症は高齢者に好発する疾患であり、それによる疼痛や運動障害が患者に与える不利益は大きい。その病因を解明することは、疾患の治療法のみならず、予防医学の面でも多大な貢献をもたらす。本研究はその点において、従来の知見とは異なる新たな方向性を示した点で重要な研究といえる。

実験方法の正確性：実験は周到に練られた計画のもとに行われ、再現性、正確性が高いと考えられる。また得られたデータの統計処理も適切になされており、信頼性の高い研究である。

表現の明瞭さ：これまでの問題点を明確に指摘し、研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考ええる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。